

**A dUTPáz sejtbeli szerepének *in vivo* analízise mikobaktériumban és
szerkezet-funkció kapcsolatának *in vitro* elemzése humán és
mikobakteriális enzimekben**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Pécsi Ildikó
Okleveles Biológus

Témavezető:

Dr. Tóth Judit

Tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

A doktori iskola vezetője:
Prof. Erdei Anna
Szerkezeti Biokémia Program
Programvezető:
Prof. Gráf László



Készült:
A Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai
Intézetében Budapesten 2011-ben.

Bevezetés és célkitűzések

A dUTPáz a dUTP hidrolízisét katalizálja, ami által a sejt számára egyrészt a dTTP nukleotid bioszintézishez szükséges dUMP prekursor molekulát biztosítja, másrészt szervesen pirofoszfát (PP_i) keletkezik. Aktivitása révén csökkenti a DNS-be hibaként beépülhető uracil mennyiségét, hozzájárulva így a nukleinsav integritásának megőrzéséhez [1]. A dTTP szintéziséért emberben 3 fő útvonal felelős (két *de novo* és egy menekítő), a mikobaktériumokban viszont egyetlen útvonal látja el ezt a feladatot, nevezetesen a *dut* gén által kódolt dUTPáz. A dUTPáz létfontosságát két szervezetben (*E.coli* és *S.cerevisiae*) korábban már leírták [2-4]. Egy genomi méretű mutagenézisen alapuló vizsgálat szerint, a dUTPáz nélkülözhetetlen a sejtosztódáshoz a *M. tuberculosis* baktériumban [5]. Az eddig ismert összes mikobakteriális genom nagyfokú hasonlósággal tartalmazza a dUTPázt, azonban ennek mikobaktériumban való létfontosságáról bizonyítékok nem állnak rendelkezésünkre. Mi a dUTPáz gén kiütésének fiziológiai hatása *in vivo M. smegmatis*-ban? Létfontosságú-e ez a fehérje, és ezáltal javasolható-e ígéretes gyógyszer célmolekulának? A mikobakteriális dUTPázok egy mikobaktérium specifikus szerkezeti motívummal is rendelkeznek, amely a humán enzimből hiányzik. Mi lehet ennek a specifikus motívumnak a szerepe *in vivo* mikobaktériumban és *in vitro* az enzimek mechanizmusban? A homotrimer dUTPázok egy flexibilis C-terminális karral rendelkeznek, amely az aktív zseb kialakításában is részt vesz [6, 7]. Ezen belül található egy P-loop-szerű hurok szekvencia. Ebben a szekvenciában található konzervált aminosavak nagymértékben járulhatnak hozzá a dUTPáz hatékony katalizálásához, ahogy ez a korábbi kristályszerkezetek alapján elmondható [8, 9]. Az egyik ilyen konzervált aminosav a humán dUTPázban a 158-as fenilalnin és a mikobakteriális enzimben a 145-ös hisztidin. Ezek az aromás oldalláncú aminosavak a szubsztrát uracil gyűrűjével mintegy átlapolva, szoros kölcsönhatást alakítanak ki. Mi lehet ennek az aromás kölcsönhatásnak a szerepe a szubsztrátkötésben és a termék felszabadulásban? A dUTPázok nagyfokú szubsztrát specificitással rendelkeznek a nukleozid foszfátlánc hosszára nézve. Megkülönböztetik az NDP (nincs hidrolízis) és NTP ligandumokat annak ellenére, hogy a hidrolízis az α - β foszfátok között történik. Miért? A szubsztrát γ -foszfátjának koordinációjáért felelős aminosavak szintén a P-loop-szerű hurok

motívumon belül található. Korábban *C.elegans*ban kimutatták, hogy a dUTPáz csendesítése embrionális letalitást eredményez az apoptózis útvonal aktivációja révén, amiben egy DNS-javító mechanizmus is részt vesz [10]. A dUTPáz csendesített hermafrodita embriókban az autofágia gének expressziója felülszabályozódik. ATF-2 és CES-2 fehérjék képesek-e kötni az *lgg-1* és *bec-1* autofágia gének promóter régióit *in vitro*? Ennek eldöntésére EMSA kísérleteket végeztünk.

Alkalmazott módszerek

- Blast-p aminosav-szekvencia analízis:

a mikobaktériumok timidin metabolizmusában szereplő enzimek hasonlóságának meghatározása.

- „Flexibilis kazetta” módszer:

kétlépcsős homológ rekombináción alapuló, több szelekciós markert tartalmazó módszer, amely egy „öngyilkos” és egy komplement plazmidnak az adott baktérium genomjába történő integrálódásán alapszik; amit a *Mycobacterium smegmatis* dUTPáz (*dut* gén által kódolt) génkiütött mutáns sejtvonalak előállításához alkalmaztunk.

- „Switching” módszer:

a komplement vektor kivágását szolgáló (pSM128) plazmid, amely rekombináz és hely specifikus integrációs forrással rendelkezik.

- Fehérje előállítás:

a mutáns *M. tuberculosis* és humán dUTPáz fehérjék létrehozásához a Stratagene cég QuikChange irányított mutagenézis kitjét használtuk.

- Fehérje expresszió:

E. coli BL21pLysS sejtekben történt. (konstrukciók: WT hDUT, hDUT^{armless}, hDUT^{F158A}, hDUT^{R/K}, hDUT^{ST/AA}, hDUT^{F158W}, mtDUT^{H145W}, és az mtDUT^{H145A}).

- Fehérje tisztítás: Ni-NTA affinitás kromatográfia

- Fehérjeminták koncentrációjának meghatározása:

Bradford módszerrel és/vagy a fehérje ultraibolya (UV) spektruma alapján történt.

- Steady-state kinetika:

a dUTPáz által katalizált reakció során felszabaduló protonok mennyiségét egy fenolvörös sav-bázis indikátor színváltozásának spektrofotometriás mérésével követtük.

- Fluorimetriás és cirkuláris dikroizmus titrálások:

a különböző mutáns dUTPáz-nukleotid komplexek disszociációs állandóit (K_d) a Jobin Yvon Spex Fluoromax-3 spektrofluoriméter és a Jasco 720 Spektropolariméter segítségével határoztuk meg.

- Gyors-kinetikai módszerek:

fluoreszcens stopped-flow méréseket (Applied Photophysics SX-20) végeztünk az aktívhely titráláshoz és a szubsztrát (dUTP) kötés vizsgálatához; quench-flow mérésekkel (RQF-3 KinTec Corp., Austin, Texas, USA) a dUTPáz által katalizált reakció során keletkezett $^{32}\text{PP}_i$ termék mennyiségét határoztuk meg.

- Röntgen diffrakciós szerkezetvizsgálat:

az mtDUT^{H145W} és mtDUT^{H145A} fehérjéknek az α,β -imido-dUTP szubsztrát analóggal alkotott komplexeinek egyidejű kristályosítása a függőcsepp módszerrel készült.

- Ioncserélő kromatográfia:

a Bio-Scale Q2 –es oszlopon (Bio-Rad) egy AKTA Purifier (GE Healthcare) kromatográfias rendszeren végeztük a kísérletet, a lehetséges dUDP hidrolízisének detektálására.

- DNS-fehérje kötési vizsgálatok (EMSA): az ATF-2 és CES-2 fehérjéknek a lgg-1, bec-1 és atg-18 autofág gének promóter régióinak kötési vizsgálataihoz.

Eredmények (tézisek)

1. A timidin bioszintézisben szereplő dUTPázt és a többi kulcsenzimeket nagyfokú hasonlósággal kódolják genomjukban a *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* és más patogén (*M. leprae*, *M. ulcerans*, és *M. bovis*) mikobaktériumok is.

2. Különböző fajokból származó (*Echerichia coli*, *Equine infectious anemia virus*, *Vaccinia virus*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Homo sapiens*) dUTPázok C-terminális aminosav szekvenciáinak illesztése egyértelműen igazolt egy 5 aminosav hosszú inzert szekvenciát, amely a mikobakteriális dUTPázokat egyértelműen megkülönbözteti a humán és más fajokban található dUTPázoktól.

3. A dUTPáz kódoló *dut* gén kiütése letális a *M. smegmatis*-ban.
4. A „switching” módszerrel maradéktalanul igazoltuk, hogy kizárólag a *dut* gén hiánya okozza a letalitást a *M. smegmatis*-ban.
5. A mikobaktérium-specifikus hurok (loop) motívum delécioja letális fenotípust mutat *M. smegmatis*-ban.
6. A *M. tuberculosis* dUTPáz loop motívum delécioja az enzim steady-state aktivitását szignifikáns mértékben nem változtatta meg (1,3- szoros V_{\max} értéksökkenés), viszont a dUPNPP ligandum kötés erősségét kismértékben (11-szeres K_d érték különbség) csökkentette.
7. A homotrimer dUTPázok aktív helyén (C-terminális részén belül található P-loop-szerű hurok szekvenciában) található fenilalanin konzervált.
8. Az mtDUTH145W kristályszerkezete az aromás kölcsönhatás konzerváltságát tükrözi.
9. Az aromás kölcsönhatás megszüntetése nincs hatással a dUTPáz általános konformációjára, sem a szubsztrátkötő zseb szerkezetére.
10. A π - π kölcsönhatás megszüntetése a steady-state reakciósebességet $0,3\text{ s}^{-1}$ –ra csökkentette a vad típushoz képest ($5,8\text{ s}^{-1}$) míg a szubsztrát kötés affinitást csak 3 x szoros mértékben csökkentette. Ezt követően gyors kinetikai mérésekkel meghatároztuk, hogy a hDUT^{F158A} mutánsban a csökkent enzimaktivitásért a hidrolízis lépés felelős.
12. A P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok nem tudnak különbséget tenni a dUDP és a dUPNPP nukleotidok kötése között (mindkettőt kötik) és a pirofoszfát kötése nem volt detektálható. Ugyanakkor a bevitt mutációk a steady-state reakciósebességet szignifikáns mértékben csökkentették. Ezt követően gyors-kinetikát alkalmaztunk annak meghatározásához, hogy az enzimechanizmus melyik lépését befolyásolhatják. Kimutattuk, hogy a hidrolízis lépés sebességi állandóját csökkentették.
13. Az ioncserélő kromatográfiás kísérletekkel igazoltuk, hogy a humán dUTPáz a dUTP analóg dUDP.BeFx komplexet nem hidrolizálja el, amit további fluoreszcencia spektrumok jelintenzitás változásai is alátámasztottak.
14. Kimutattuk, hogy az CES-2 köti a *bec-1* gén promóter szakaszát és az ATF-2 fehérje is kötődik a *bec-1* és az *lgg-1* gének promóter régióihoz, specifikusan. Mivel a mutáns génekkel történt kísérlet során fehérje-DNS komplex képződést nem detektáltunk.

Következtetések

1. Kimutattuk, hogy a *dut* gén által kódolt dUTPáz enzim esszenciális a *M. smegmatis*ban *in vivo*, továbbá a mikobakterium specifikus motívum is nélkülözhetetlen a baktérium növekedéséhez. Szekvencia elemzésekkel igazoltuk, hogy a *M. smegmatis* és a *M. tuberculosis* fajokon kívül más patogén mikobaktériumok genomjában is megtalálható a dUTPáz és a timidin bioszintézisben résztvevő többi enzimek is, nagyfokú hasonlósággal.

2. Kimutattuk, hogy a loop deléciója nem járt drasztikus aktivitásbeli és szubsztrátkötési következményekkel. Kristályszerkezetben jól látható, hogy az öt aminosav (AGLAS) a homotrimer fehérje monomer egységeinek a felszínén egy hurok konformációt alakít ki. Ezek a tények arra engednek következtetni, hogy ez a mikobaktérium specifikus inzert egy kölcsönható partnernek, avagy ligandumnak szolgáltathat kötőhelyet. Ez alapján, feltételezhetjük, hogy ez a kölcsönhatás közvetítheti a loop motívum esszencialitását, amit az *in vivo* kísérletekben kimutattunk.

3. Kimutattuk, hogy a dUTPázok aktív helyén található aminosav, amelyik a szubsztrát uracillal átlapol az aromás oldallánc tekintetében konzervált, amit kristályszerkezetekkel is igazoltunk. Stopped-flow és quench-flow módszerekkel igazoltuk, hogy a mutáns hDUT^{F158A} csökkent aktivitásáért a hidrolízis lépés a felelős. Fluoreszcencia kísérletekkel kimutattuk, hogy az átmeneti állapottól a következő konformációs állapot eljutásáig további F-jelkioltás történik, ami feltételezhetően az enzim és a szubsztrát között kialakult π - π kölcsönhatásnak tulajdonítható. Konklúzióként elmondhatjuk, hogy a dUTPázban található konzervált aromás aminosavnak a szubsztráttal alkotott elektrosztatikus kölcsönhatása, a foszfátészter hidrolízist az átmeneti állapot stabilizációja révén elősegíti.

4. Kimutattuk, hogy a másodlagos kölcsönhatások megszüntetése a P-loop-szerű hurok motívum és a szubsztrát γ -foszfátja között csökkentette az enzim-szubsztrát komplex katalitikusan kompetens konformációjának a kialakulását. Steady-state aktivitásméréseink igazolták, hogy a hidrolízis mindegyik mutánsban megtörténik az okozott mutáció mértékének függvényében. Feltételezhetjük, hogy a di-és a tri-foszfát nukleotidok megkülönböztetése a γ -foszfát és a P-loop-szerű hurok motívum között kialakult kölcsönhatás révén következik be. Ioncserés kísérleteink eredményei arra

engednek következtetni, hogy a γ -foszfát és a nukleotid többi része között kialakuló foszfátészter kötés teljes egészében szükségeltetik ahhoz, hogy a P-loop-szerű hurok motívum hatása a hidrolízis helyén, az α -foszfáton érvényesüljön.

5. A dUTPáz funkcionális szempontból két releváns fehérjével, a *Campylobacter jejuni* kétfunkciós dUDP/dUTPázával és a *Dictyostelium discoideum* II-es miozinnal hasonlítottuk össze. A következőket találtuk: i) a kétfunkciós enzim esetében a kötött dUTP γ -foszfátját egyedül csak vízmolekulák koordinálják, míg a dUTPázban a szubsztrát γ -foszfátja és a P-loop-szerű hurok motívum között másodlagos kölcsönhatások vannak; ii) a kétfunkciós dUDP/dUTPáz enzim nem rendelkezik P-hurok motívummal. iii) míg a miozinoknál a P-hurok körbeveszi mindkét foszfátot (β és γ), addig a dUTPáz esetében a P-loop-szerű hurok struktúra kizárólag a γ -foszfáttal alakít ki kölcsönhatást. Ez a különbség feltehetőleg a dUTPáz P-loop-szerű hurok motívumának elhelyezkedésével hozható összefüggésbe, amely a C-terminális karon belül található, ahol szubsztrátjával egy fedő („eclipsed”) dUTP kötött konformációt alakít ki.

6. Az összehasonlítások eredményeképpen feltételezhető, hogy a dUTPáz P-loop-szerű hurok motívumának egyedi szerepét feltehetőleg funkcionális adaptációval szerezte meg az enzim, a DNS hibajavító rendszerek egyidejű tökéletesedésével.

7. Kimutattuk, hogy az ATF-2 fehérje specifikusan kötődik a *bec-1* és az *lgg-1* promóterekhez. Elmondhatjuk, hogy az autofág gének és az apoptotikus útvonal egymást kiegészítve szabályozhatják a *C.elegans* korai egyedfejlődését. A sejtbeli dUTPáz aktivitás csökkenése és a timidin anyagcserére ható metabolitok ezt a kettős élet-halál választ hatékonyan képesek kiváltani.

Összefoglalás

Összefoglalásként elmondhatom, hogy a dUTPáz enzim és az 5 aminosavból álló hurok motívuma létfontosságú a *M. smegmatis* organizmusban. Érdekes módon a *M. tuberculosis* dUTPáz hurok motívumának a törlésével nem szűnt meg az aktivitása. A dUTPázok foszfátészter hidrolízisének hatékonyságához, az aromás π - π kölcsönhatás az átmeneti állapot stabilizációja révén nagymértékben hozzájárul. Továbbá a dUTPázok nagyfokú szubsztrát specifitását, a nukleozid foszfátlánc hosszára nézve, a P-loop-szerű hurok motívum megjelenése és funkciója biztosítja, kísérleteink eredményei alapján.

Továbbá a dUTPáznak a *C.elegans* egyedfejlődésében egy közvetítő szerepet feltételezhetünk az autofág gének és az apoptózis útvonal között.

Tézisek alapjául szolgáló publikációs lista

Pecsi I*, Leveles I*, Harmat V, Vertessy BG, Toth J. „*Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase* „ **Nucleic Acids Res.** 2010 Nov 1;38(20):7179-86. Epub 2010 Jul 2. *megosztott első szerzők

Erdélyi P, Borsos E, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, Sengupta T, Dengg M, **Pécsi I**, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, Vellai T. „*Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in Caenorhabditis elegans* ” **J Cell Sci.** 2011 May 1;124(Pt 9):1510-8.

Ildiko Pecsi, Rita Hirmondo, Amanda C.Brown, Anna Lopata, Tanya Parish, Beata G. Vertessy and Judit Toth. „*The dUTPase enzyme is required for mycobacterial viability* ” **A Journal of Bacteriology**-ba elbírálás alatt. 2011

Ildiko Pecsi*, Judit Szabo*, Scott Adams, Istvan Simon, James R. Sellers, Beata G. Vertessy and Judit Toth. „*Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination* „ **PNAS**-be elbírálás alatt. 2011
*megosztott első szerzők

Szóbeli előadás (előadó neve aláhúzva)

Pécsi Ildikó, Hirmondó Rita, Amanda C. Brown, Lopata Anna, Tanya Parish, Vértessy G. Beáta és Tóth Judit. „*A dUTPáz enzim faj specifikus szerkezeti motívumának esszencialitása a Mycobacterium smegmatisban: új célmolekula azonosítása a tuberkulózis gyógyszerterápiában*” IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésvirológiai Napok. Siófok, 2011. március 25-27.

Poszter előadások (előadó neve aláhúzva):

- 1.) I. Pecsí, R.Hirmondo, A. C. Brown, A. Lopata, T. Parish, V. G. Beata and J. Toth
P1017, „*A genus-specific loop in dUTPase is essential for mycobacterial viability*”
21st ECCMID 27th ICC (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases and International Congress of Chemotherapy) Milan, Italy 7-10 May 2011.
- 2.) Ildiko Pecsí, Rita Hirmondo, Amanda C.Brown, Anna Lopata, Tanya Parish, Beata G. Vertessy and Judit Toth. Pos-360: “*Proving the essentiality of dUTPase mediated by its mycobacterium-specific structural motif identifies a novel TB drug target*”
Keystone Symposia, Mycobacteria: Physiology, Metabolism and Pathogenesis- Back to the Basics; January 15-20, 2011 Vancouver, Canada.
- 3.) Ildiko Pecsí, Tanya Parish, Amanda C. Brown, Beata G. Vertessy and Judit Toth.
Pos-B245: “*Essentiality of dUTPase, a key enzyme in the thymidylate synthesis pathway in mycobacteria*” The EMBO meeting 2010 Barcelona 4-7 September.
- 4.) Ildiko Pecsí, Judit E. Szabo, Beata G.Vertessy, Judit Toth;
2325-Pos: “*The role of P-loop in the enzymatic mechanism of nucleotide pyrophosphatases*” Biophysical Society; February 2010 San Francisco, California.
- 5.) Judit Toth, Ildiko Pecsí, and Beata G. Vertessy. 272.02-Pos “*The Role of γ -phosphate Binding in the Catalytic Mechanism of dUTPase*” Biophys. J. 2008 94: 272-b. San Francisco, California.
- 6.) Judit Toth, Ildiko Pecsí, Scott Adams, Beata G. Vertessy.
“*The role of P-loop in the mechanism of α - β phosphate; nucleotide hydrolysis catalyzed by dUTPase*” The International conference on Arginine and Pyrimidines 2008 London.
- 7.) Pecsí Ildiko, Borsos Eva, Takacs Krisztina, Vellai Tibor, Toth Judit and Vertessy G. Beata. “*Study of the dUTPase enzyme function and mechanism on C.elegans model organism*” Institute of Enzymology, BRC Budapest, Faculty of Science of Eotvos Lorand University, Department of Genetics, Budapest, Hungary 2007.

Irodalomjegyzék

1. Vertessy, B.G. and J. Toth, *Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases*. Acc Chem Res, 2009. 42(1): p. 97-106.

2. el-Hajj, H.H., H. Zhang, and B. Weiss, *Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1988. 170(3): p. 1069-75.
3. Gadsden, M.H., et al., *dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 1993. 12(11): p. 4425-31.
4. Guillet, M., P.A. Van Der Kemp, and S. Boiteux, *dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(7): p. 2056-66.
5. Sassetti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin, *Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis*. Mol Microbiol, 2003. 48(1): p. 77-84.
6. Mol, C.D., et al., *Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits*. Structure, 1996. 4(9): p. 1077-92.
7. Barabas, O., et al., *Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase*. J Biol Chem, 2004. 279(41): p. 42907-15.
8. Chan, S., et al., *Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis dUTPase: insights into the catalytic mechanism*. J Mol Biol, 2004. 341(2): p. 503-17.
9. Nemeth-Pongracz, V., et al., *Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins*. Nucleic Acids Res, 2007. 35(2): p. 495-505.
10. Dengg, M., et al., *Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates*. EMBO Rep, 2006. 7(10): p. 1046-51.